昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, November 2011, 54(11): 1249－1257　　ISSN 0454-6296

甜菜夜蛾过氧化氢酶 cDNA 序列克隆、序列分析和表达特征

胡　振，左洪亮，李亚楠，黄劲飞，胡美英*
（华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室，广州 510642）

摘要：过氧化氢酶（catalase，CAT）作为生物体内的重要物质，其主要功能是参与活性氧代谢过程，在清除 H_2O_2、超氧自由基和过氧化物以及阻止羟基自由基形成等方面发挥着重要作用。本研究利用 RT-PCR 技术和 RACE 方法首次克隆和分析了甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Hübner）CAT 基因，命名为 *SexiCAT*，GenBank 登录号为 JN051294，其 cNDA 序列全长为 1 755 bp，开放阅读框长 1 524 bp，推测编码 507 个氨基酸。经氨基酸序列比对，此多肽序列具有高度保守性，与其他昆虫 CAT 的序列一致性分别为：家蚕 *Bombyx mori*（87%）、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（73%）、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（71%）和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（70%）。对该基因在甜菜夜蛾各个发育时期以及不同组织表达量的荧光定量 PCR 分析表明，*SexiCAT* 基因在甜菜夜蛾各个发育阶段的表达水平存在显著差异，其中成虫期的表达量最高，是卵期表达量的 7 倍，幼虫期次之，卵期最低；*SexiCAT* 基因在 5 龄幼虫体壁、中肠、脂肪体和马氏管组织中都有表达，但在脂肪体中表达量最高。甜菜夜蛾 *SexiCAT* 基因的成功克隆及同源建模将为今后对其功能研究以及作为靶标设计新型氧化酶抑制剂提供了基础。

关键词：甜菜夜蛾；过氧化氢酶；基因克隆；序列分析；同源建模；表达谱
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)11-1249-09

Cloning, sequence analysis and expression profiling of cDNA coding for catalase from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)

HU Zhen, ZUO Hong-Liang, LI Ya-Nan, HUANG Jin-Fei, HU Mei-Ying* (Key Laboratory of Natural Pesticide & Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Catalase (CAT), one of most important enzymes in organism, plays an essential role in active oxygen metabolism and preventing the formation of free hydroxyl radicals by clearing hydrogen peroxide, superoxide radical and peroxides. In this study, the full-length cDNA of CAT gene from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, was cloned and characterized by RT-PCR and RACE technique, which is 1 755 bp in length and named as *SexiCAT* (GenBank accession no. JN051294). The open reading frame (ORF) of *SexiCAT* is 1 524 bp encoding 507 amino acid residues. The amino acid sequence of SexiCAT shares a significant identity with catelases of *Bombyx mori* (87%), *Drosophila melanogaster* (73%), *Aedes aegypti* (71%), and *Tribolium castaneum* (70%). The temporal expression profiling revealed that *SexiCAT* was expressed in different developmental stages of *S. exigua* at different expression levels, with the highest level in adults, the second highest level in larvae and the lowest level in eggs, and the expression level in adults was 7 times as high as that in eggs. Tissue expression profiling further indicated that in 5th instar larvae of of *S. exigua SexiCAT* transcript was observed in the integument, midgut, fat body and Malpighian tubules, with the highest expression level in fat body. This study provides a foundation for understanding the functions and applications of CAT as a new target for oxidase blocking agent.

Key words: *Spodoptera litura*; catalase (CAT); gene cloning; sequence analysis; homology modeling; expression profile

---

基金项目：国家自然科学基金项目(31171870)
作者简介：胡振，男，1987 年生，湖北武汉人，硕士研究生，研究方向为农药分子毒理学，E-mail：huzh111@163.com
* 通讯作者 Corresponding author，Tel.：020-85280308；E-mail：humy@scau.edu.cn
收稿日期 Received：2011-07-01；接受日期 Accepted：2011-09-25

过氧化氢酶(catalase, CAT)是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的抗氧化酶，除了少数需氧生物之外，如 *Mycoplasma pneumonia*、绿藻 *Euglena*、*Bacillus propilliae* 及几种寄生虫，几乎所有的需氧生物体内都存在过氧化氢酶。它在生物演化过程中是生物建立防御系统的关键酶之一，其生物学功能是催化细胞内过氧化氢的分解，从而使细胞免于活性氧(reactive oxygen species, ROS)分子的毒害(Cadenas *et al*., 1997)。

近年来，过氧化氢酶越来越引起人们的广泛关注，在动物中，大量研究表明，细胞的衰老往往会伴随着 ROS 的增加，因此在正常生理代谢下产生的过量 ROS 氧化损伤可能是引起衰老的生理学原因之一(Kregel and Zhang, 2007)。在动物细胞中，CAT 主要存在于过氧化物酶体中，同时它也是 H_2O_2 的重要来源，不仅负责清除过氧化物酶体产生的 H_2O_2，而且也可以进一步清除从细胞其他部位扩散来的 H_2O_2(Terlecky *et al*., 2006; Schrader and Fahimi, 2006)。因此，在很大程度上 CAT 决定着细胞的抗氧化能力，并且进一步影响着细胞的衰老。有研究结果表明，小鼠的 CAT 基因表达上调能够有效地降低其凋亡基因的表达，并且延长小鼠的寿命(Schriner *et al*., 2005; Brezniceanu *et al*., 2008; Hasegawa *et al*., 2008)。相反，用抑制剂 3-氨基-1,2,4-三唑 (3-amino-1,2,4-triazole, 3-AT)抑制过氧化物酶体中 CAT 的活性，导致处理的细胞 CAT 活性下降到正常细胞的 38% 时，细胞则会呈现出级联加速衰老的现象(Koepke *et al*., 2008)，由此可见，CAT 在促进和阻止哺乳动物衰老过程中起着重要作用(Brown-Borga *et al*., 2000)。

同时，在植物中也有研究表明，CAT 在植物的抗逆性上起着重要的作用，例如：日本北海道绿色生物研究所采用基因工程方法，在水稻中导入并表达过氧化氢酶基因，由于提高过氧化氢酶活性，赋予了水稻耐低温性能(Matsumura *et al*., 2002)。另外，Shikanai 等(1998)和 Miyagawa 等 (2000)分别验证了在烟草植株中转入大肠杆菌 *Escherichia coli* 过氧化氢酶基因，其植株叶绿体内的过氧化氢酶在干旱、光和除草剂等诱导的氧化胁迫中表达量显著地提高(Cadenas *et al*., 1997; Miyagawa *et al*., 2000)。同时，Polidoros 等(2001)将玉米的 CAT2 基因转入烟草，经检测发现转基因烟草植株对除草剂引起的伤害抗性大大增强，说明了过氧化氢酶也能提高植物对除草剂的抗性。

然而，与动植物相比，昆虫中 CAT 的研究相对较少，20 世纪 90 年代，Orr 等(1990)首先克隆了黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* CAT 基因并在体内过量表达，引起果蝇生命周期的延长，同时又有研究表明，羽化后的果蝇缺失过氧化氢酶基因将会直接导致死亡(Griswold *et al*., 1993)。之后，蜜蜂 *Apis mellifera*、家蚕 *Bombyx mori* 和南极蚊 *Belgica antarctica* CAT 基因也都相继克隆成功(Yamamoto *et al*., 2005; Lopez-Martinez *et al*.,2008)，这些为昆虫 CAT 基因深入的研究奠定了坚实基础。甜菜夜蛾 *S. exigua* 是一种世界性分布、间歇性大发生的以危害蔬菜为主的杂食性害虫，近年来，在我国南方地区该虫对菊酯类和有机磷等杀虫剂产生了很高的抗药性，造成频繁暴发，因此，对昆虫过氧化氢酶基因的抑制将有可能发展成为害虫防治的新方法和新的途径。本研究采用 RT-PCR 结合 RACE 技术，克隆得到了甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) CAT 基因，对得到的甜菜夜蛾 CAT 基因序列进行了生物学和同源建模分析，并通过荧光定量 PCR 技术研究了该基因在甜菜夜蛾各个发育阶段以及不同组织的表达谱，以期为今后从分子角度深入了解 CAT 作为昆虫潜在的靶标基因提供重要基础，并最终为害虫防治提供新的思路和途径。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及主要试剂

甜菜夜蛾 *S. exigua* 为本实验室长期用人工饲料饲养，饲养条件为 26 ± 1℃，光周期 16L:8D, RH 70%~80%。在甜菜夜蛾不同发育阶段及 5 龄幼虫不同组织部位分别取样，置于 -80℃中保存备用。

总 RNA 抽提 Trizol 试剂盒购自 Omega 公司，琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒购自 Tiangen 公司。Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker, AMV 反转录酶、pMD20-T 载体、大肠杆菌感受态细胞 DH5α 均购自 TaKaRa 公司。定量 PCR 试剂盒购自 Transgen 公司，Gene Racer™ Kit 试剂盒购自 Invitrogen 公司，所用引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 总 RNA 的抽提与 cDNA 第一链的合成

参照 Omega 公司总 RNA 抽提 Trizol 试剂盒使用说明，取甜菜夜蛾 *S. exigua* 不同发育阶段的样品用液氮研磨后进行提取，然后参照 TaKaRa 公司的 AMV 反转录酶使用说明书合成 cDNA 第一链，并于 -20℃保存。

1.3　引物设计及合成

根据 NCBI(http://www. ncbi. nlm. nih. gov/) 登录的黑腹果蝇 *D. melanogaster* (GenBank 登录号 NM_164426) 和家蚕 *B. mori* (GenBank 登录号 NP_001036912) 的 CAT 基因序列，设计简并引物 CAT-F 和 CAT-R(表 1)，由英潍捷基(上海) 贸易有限公司合成。

1.4　甜菜夜蛾 CAT 基因片段序列的 RT-PCR 扩增

以甜菜夜蛾 *S. exigua* 2 龄幼虫 cDNA 第一链为模板，利用简并引物 CAT-F 和 CAT-R 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为：94℃ 4 min；94℃ 30 s，53℃ 45 s，72℃ 1 min，35 个循环；72℃ 10 min。

利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对上述 PCR 产物进行分析，用 DNA 琼脂糖纯化回收试剂盒纯化目的片段。将纯化产物连接至 pMD20-T 质粒载体 (TaKaRa 公司)，然后转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中。挑取白色菌落，培养后参照 Sambrook 等 (1989) 的方法提取质粒，用 PCR 方法进行重组质粒的鉴定。选择经过 PCR 鉴定为阳性的菌液进行序列测定(上海英骏生物技术有限公司)。

1.5　甜菜夜蛾 CAT 基因末端序列的 RACE 扩增

根据上述克隆获得的 5′端编码区 CAT 片段序列，设计合成 1 条特异性引物 CAT-3 (表 1)，用于甜菜夜蛾 CAT 基因的 3′RACE 扩增。3′RACE 以特异性引物 CAT-3 和 Oligo(dT)$_{20}$ 组合进行 PCR 扩增。反应程序为：94℃ 预变性 3 min；然后 94℃ 变性 30 s，55℃ 退火 45 s，72℃ 延伸 1 min，共 35 个循环；最后 72℃ 延伸 10 min。

表 1　本研究中所用引物

Table 1　Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5′-3′)
简并引物 Degenerate primers	CAT-F：ATGGCTKSAMGMGAYSCRGCT
	CAT-R：TAGATAMAAYCTSACTGSTGAT
3′RACE 特异引物 3′RACE specific primers	CAT-3：ATGAACAACCAGGAGGGATG
荧光定量 PCR 引物 Specific primers of qRT-PCR	CAT-dF：AATGGATATGGTTCCCACACCT
	CAT-dR：AATGCCCTGGTTCGTCTTGT
内参引物 Specific primers of reference gene	A-F：CGTCCCCATCTACGAAGGTT
	A-R：AGCGGTGGTGGTGAAAGAG

1.6　序列分析与分子进化树的构建

应用 DNAStar 软件推测甜菜夜蛾 CAT 基因的氨基酸序列、蛋白分子量以及等电点，并通过在线生物学软件 http://www. ncbi. nlm. nih. gov/blast 对推测的氨基酸序列与 GenBank 已知序列进行比较分析，应用在线软件 http://bioinfo. genotoul. fr/multalin/multalin. html 进行多序列比对分析。分子进化树由 PHYLIP 软件构建获得，采用邻位相连的方法和 1 000 次重复分析。

1.7　同源建模

运用 Discovery Studio 2. 0 软件的 Build Homology Models 模块，对甜菜夜蛾 CAT 的三级结构进行了同源性建模，并在 PDB 蛋白结构数据库中进行序列相似性搜索，从而确定同源性高的蛋白作为模板用于 CAT 三维结构的模建。预测 10 个模型，用不同的参数进行评价后选取分数最高的模型为模建的最后结果，并对该模型进行氨基酸合理性分析。

1.8　实时荧光定量分析

采用比较 C_T 值法的相对定量法(Livak and Schmittgen, 2001)，分析甜菜夜蛾 CAT 基因在甜菜夜蛾不同发育阶段以及 5 龄幼虫组织中的相对表达量。PCR 反应在 ABI Prism 7000 (美国应用生物系统公司) 中进行。荧光定量 PCR 采用 25 μL 体系，各反应成分的含量为：cDNA 模板 1 μL，SYBR mGreen Realtime PCR Master Mix 12.5 μL，10 μmol/L 的上、下游引物各 0.5 μL，灭菌超纯水 10.5 μL，PCR 反应 条件为：94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 30 s，55℃ 退火 45 s，72℃ 延伸 45 s 共 40 个循环。反应中设置以灭菌超纯水为阴性对照组，以持家基因 *actin* 为内参基因，每个样品进行 3 次重复测定。用 ABI Prism 7000 SDS 1.1软件进行数据记录分析，产生熔解曲线，其中阈值线由软件自动设定。

1.9　数据统计与分析

实时荧光定量分析数据采用邓肯氏新复极差检验法(DMRT 法) 进行比较各阶段相对表达量的差异。

2 结果与分析

2.1 甜菜夜蛾 CAT 基因 cDNA 编码区全长的克隆及分析

以甜菜夜蛾 2 龄幼虫的 cDNA 为模板，以 CAT-F 和 CAT-R 为上下游引物对甜菜夜蛾 CAT 基因进行 PCR 扩增，鉴定得到 1 条约 1 281 bp 的具有 5′启动子 ATG 的片段，据此设计特异性引物，进行 3′RACE 扩增，得到一条 582 bp 的下游序列。根据得到的 2 个甜菜夜蛾 CAT 的 cDNA 片段，将序列中的重复区域去除，拼接得到甜菜夜蛾 CAT 的完整编码区序列，该序列全长 1 755 bp，其中编码区序列长为 1 524 bp，共编码 507 个氨基酸(图 1)，命名为 *SexiCAT*，GenBank 登录号 JN051294。预测蛋白分子量为 56.89 kD，等电点为 8.42。

2.2 SexiCAT 多序列比对及进化树分析

多序列比对分析表明昆虫间 CAT 基因非常保守，此克隆的甜菜夜蛾 CAT 与黑腹果蝇 *D. melanogaster*、家蚕 *B. mori*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 等 6 种昆虫的 CAT 氨基酸序列相比较，结果显示它们之间具有极高的同源性(图 2)，SexiCAT 与同为鳞翅目的家蚕的氨基酸序列一致性最高，达 87%；与黑腹果蝇的同源性为 73%，而与埃及伊蚊和赤拟谷盗的一致性分别为 71% 和 70%。

为研究 SexiCAT 基因与其他物种之间的进化关系，采用 MEGA4.1 软件中的邻位相连法(Neighbor-joining)构建了系统进化树，系统发生树进行了 1 000次重复构建(图 3)。由图 3 可知：不同物种之间的氨基酸序列差异较大；而同物种同一目昆虫之间的差异较小，其中，SexiCAT 与鳞翅目的家蚕氨基酸序列差异最小，而与鞘翅目的赤拟谷盗、双翅目的埃及伊蚊等的氨基酸序列差异较大，这与它们在分类地位上的亲缘关系远近是一致的，但昆虫 CAT 与哺乳动物之间的距离较远，这也符合它们在分类地位上相隔较远的规律，该进化树较好地反映了各物种 CAT 之间的进化关系。

2.3 SexiCAT 的同源建模及可靠性分析

利用 Blast 程序对 PDB 库进行 SexiCAT 的同源蛋白的搜索，编号为 1DGB (Putnam *et al.*, 2000)的蛋白与 SexiCAT 的氨基酸序列一致性最高，达到 67%。应用 Discovery Studio 2.0 软件的 Build Homology Models 模块，以 1DGB 为模板对 SexiCAT 的三级结构进行了同源建模，如图 4 所示，主要由内部的 β 折叠及两侧的 α 螺旋组成 αβ/βα 结构，并且有一些 β 转角结构。同时应用 Discovery Studio 软件中的 Profile-3D 模块对已经构建好的 SexiCAT 三维结构模型进行可靠性分析，结果如图 5 所示。通过 Profile-3D 分析可知，除了 N 端(肽链的两端的得分允许小于 0)，绝大部分氨基酸残基的 Profile-3D 得分都大于 0，这说明大部分氨基酸残基都处于合理位置。为进一步直观地展示 SexiCAT 三维结构模型好坏，我们采用拉曼图的形式展示 (图 6)，蓝色区域以内的残基结构非常合理，而处于蓝色以外紫色区域以内的残基结构比较合理，位于这两个区域以外的残基结构则合理性较差。由图可以看出，SexiCAT 蛋白中 98% 的氨基酸残基结构合理。由上述 Profile-3D 和拉曼图分析表明同源建模的 SexiCAT 的三维结构是可靠的。

2.4 *SexiCAT* 在甜菜夜蛾不同发育阶段以及不同组织的表达谱

以甜菜夜蛾 1 龄幼虫 CAT 基因的 mRNA 含量作为基准含量，对 *SexiCAT* mRNA 的表达量随不同发育时期的变化进行分析，由图 7 可知，*SexiCAT* 在甜菜夜蛾各发育阶段均有表达，这与虫体发育各阶段自身抗氧化能力的生理规律基本相一致，其中，卵、初孵幼虫、1 龄幼虫的表达量都较低，但从 2 龄幼虫开始 *SexiCAT* mRNA 的表达量出现大幅度增加，成虫 mRNA 的表达量达到最高，与最低时期卵的表达量相比约 7 倍。同时，本研究对 *SexiCAT* mRNA 的表达量在不同组织中变化也进行了分析(图 8)。由图 8 可知 *SexiCAT* mRNA 在甜菜夜蛾 5 龄幼虫脂肪体中的含量最高，另外在体壁、中肠、马氏管都有表达，其中在中肠组织里表达最低，与最高表达量的脂肪体相差约 37 倍。

3 结论与讨论

本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术，成功克隆获得甜菜夜蛾过氧化氢酶 CAT 基因 *SexiCAT* 编码区全长，并分析了 *SexiCAT* 基因及其编码蛋白的基本结构特征和表达特点，为今后进一步研究其生理功能，筛选高效抑制剂，进而设计新型氧化酶抑制剂提供了有益的参考信息。我们通过多序列比对分析发现，CAT 基因在昆虫中具有较高的保守性，但昆虫 CAT 基因与哺乳动物之间差异较大(图 2, 3)，这不仅体现了物种之间不同的进化关系，而且也为

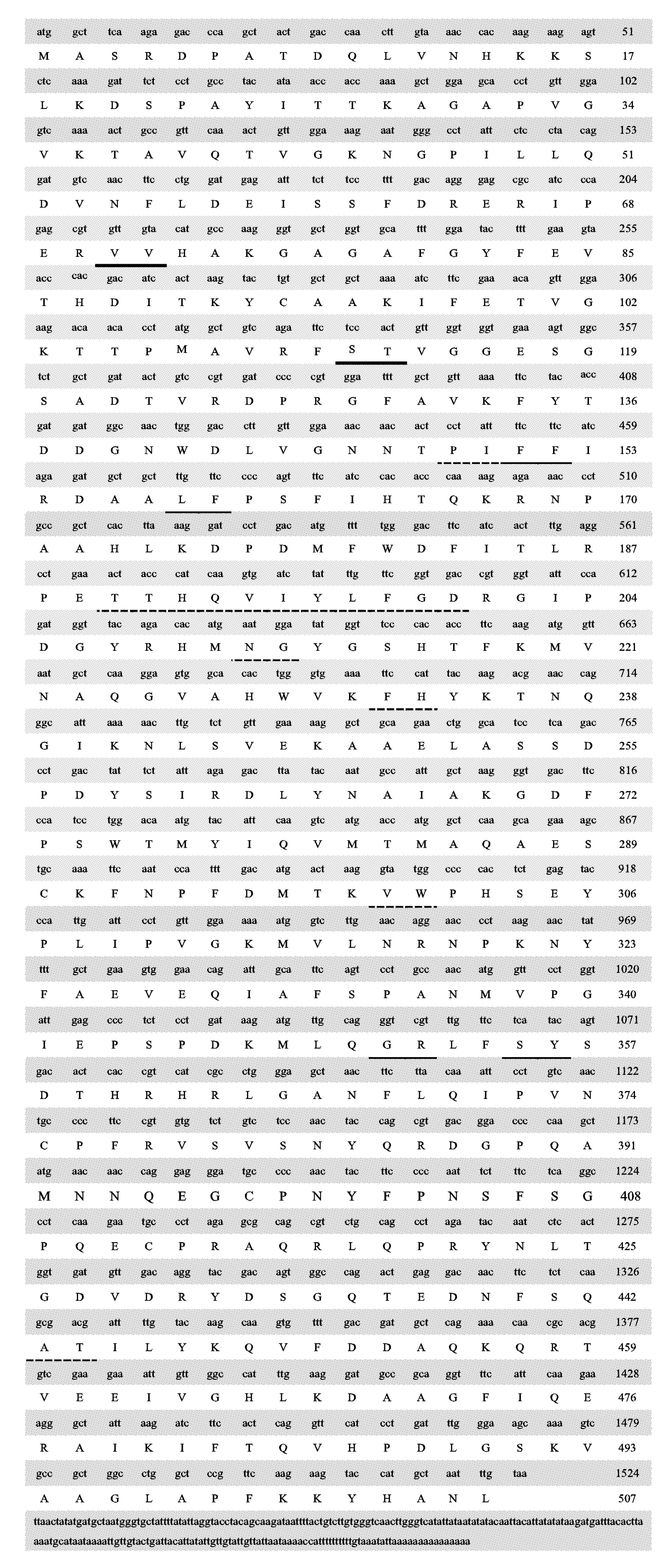


图 1　甜菜夜蛾 *SexiCAT* cDNA 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　cDNA nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of *SexiCAT* in *Spodoptera exigua*

划横线区表示亚铁血红素结合位点，划虚线区表示 NADPH 结合位点。The bar denotes residues interacting with a heme group, and the dotted line indicates NADPH binding residues.

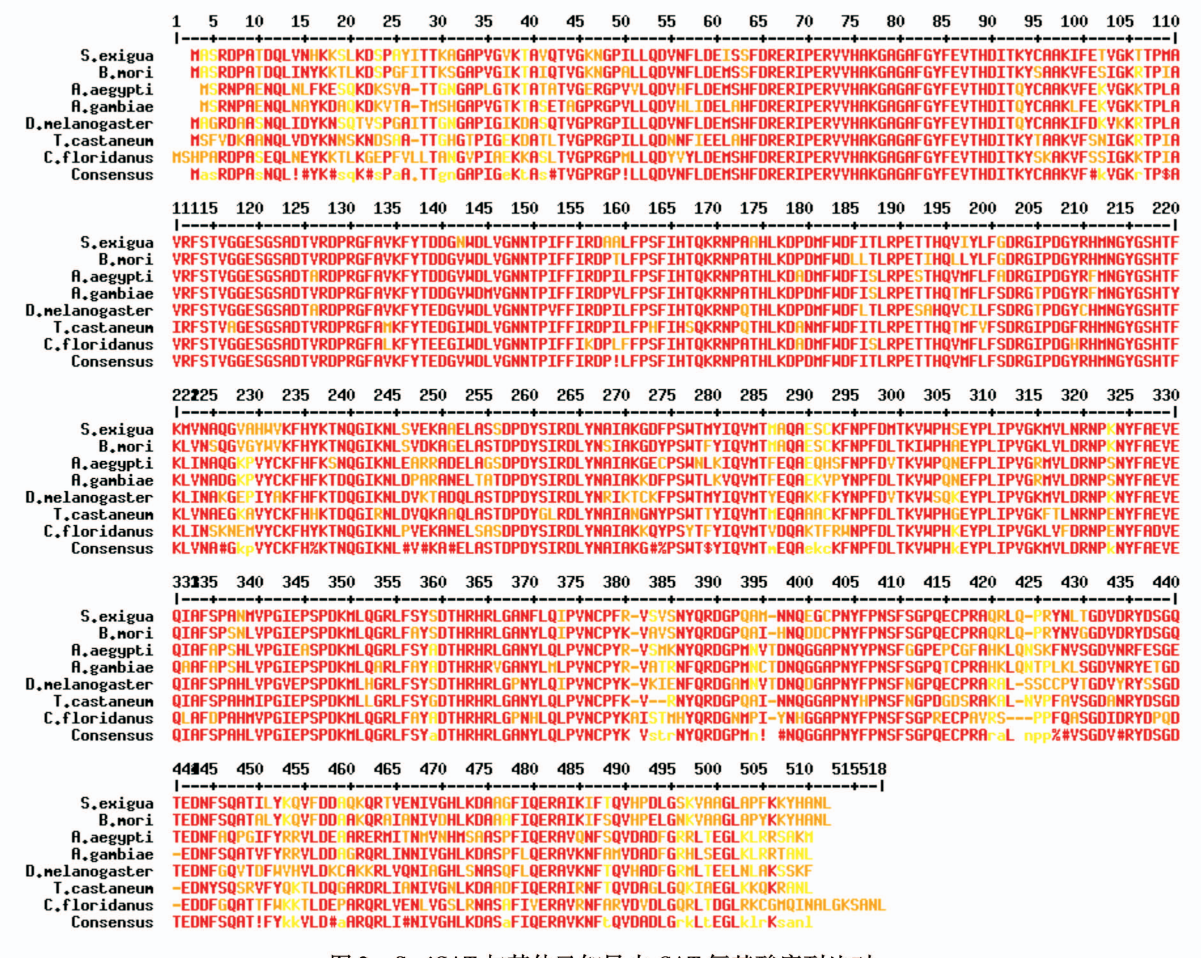


图 2 SexiCAT 与其他已知昆虫 CAT 氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of the SexiCAT with known CAT of other insects

S. exigua: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*; B. mori: 家蚕 *Bombyx mori*; A. aegypti: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*; A. gambiae: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*; T. castaneum: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; C. floridanus: 佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*; D. melanogaster: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*.

抑制干扰该蛋白的生理生化功能提供了理论基础。现已有研究表明，在多种昆虫中，过氧化氢酶在生命周期和繁殖能力方面起着决定性的作用，例如，Diaz-Albiter 等(2011)利用 RNA 干扰技术成功沉默了长须罗蛉 *Lutzomyia longipalpis* CAT 基因，使得其死亡率显著增加和卵母细胞的大量减少；Orr 等(1990)在黑腹果蝇 *D. melanogaster* 体内使 CAT 基因过量表达，引起果蝇生命周期的延长；Magalhaes 等(2008)也证明了对冈比亚按蚊 CAT 基因进行有效的沉默，使得其由 ROS 大量增加而导致的死亡。

目前昆虫中 CAT 的基因结构研究资料并不是很丰富，不易比较不同昆虫间 CAT 的共同点与差异性。本研究获得的 *SexiCAT* 序列全长 1 755 bp，开放阅读框长 1 524 bp，编码 507 个氨基酸，与 Yamamoto 等(2005)对家蚕 CAT 基因(GenBank 登录号 NP_001036912)的研究结果比较可知，家蚕 CAT 编码区全长 1 524 bp，编码 507 个氨基酸，与 *SexiCAT* 完全一致，同时在已知不同种属的昆虫 CAT 中都具有亚铁血红素结合位点(Murthy *et al.*, 1981)和 NADPH 结合位点(Putnam *et al.*, 2000)。本研究运用 qRT-PCR 技术测定分析了 *SexiCAT* 在甜菜夜蛾不同发育阶段及组织部位的表达特征，结果表明，*SexiCAT* 在甜菜夜蛾各个发育阶段都有表达，但在卵期和低龄幼虫的表达量显著低于蛹期和成虫阶段，成虫期表达量最高，是卵期最低表达量的 7 倍(图 7)。该结果与南极蚊 *B. antarctica* 的 CAT 基因表达模式相类似(Lopez-Martinez *et al.*, 2008)。那么这些结果是否预示着昆虫 CAT 的功能保守性很强，有待于今后研究证实。同时，*SexiCAT* 还不仅表达于甜菜夜蛾的体壁、中肠、马氏管组织中，而且在脂肪体中有较高的表达，这可能是与脂肪体作为营养物质中间代谢的场所，拥有的丰富生



图 3　甜菜夜蛾与其他物种基于 CAT 同源基因编码氨基酸序列的系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic tree based on amino acid sequences of CAT from *Spodoptera exigua* and other organisms

S. exigua：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*；B. mori：家蚕 *Bombyx mori*；A. aegypti：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*；A. gambiae：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*；T. castaneum：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*；C. floridanus：佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*；D. melanogaster：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*；P. perniciosus：白蛉 *Phlebotomus perniciosus*；L. longipalpis：长须罗蛉 *Lutzomyia longipalpis*；P. vanderplanki：摇蚊 *Polypedilum vanderplanki*；C. plicata：褶纹冠蚌 *Cristaria plicata*；F. chinensis：明对虾 *Fenneropenaeus chinensis*；C. quinquefasciatus：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*；C. farreri：栉孔扇贝 *Chlamys farreri*；G. morsitans morsitans：刺舌蝇 *Glossina morsitans morsitans*；H. saltator：印度跳蚁 *Harpegnathos saltator*；B. plicatilis：臂尾轮虫 *Brachionus plicatilis*；P. fucata：合浦珠母贝 *Pinctada fucata*；L. vannamei：南美白对虾 *Litopenaeus vannamei*；M. undulatus：虎皮鹦鹉 *Melopsittacus undulatus*；D. rerio：斑马鱼 *Danio rerio*；M. musculus：小家鼠 *Mus musculus*；H. sapiens：人类 *Homo sapiens*；C. idella：草鱼 *Ctenopharyngodon idella*.

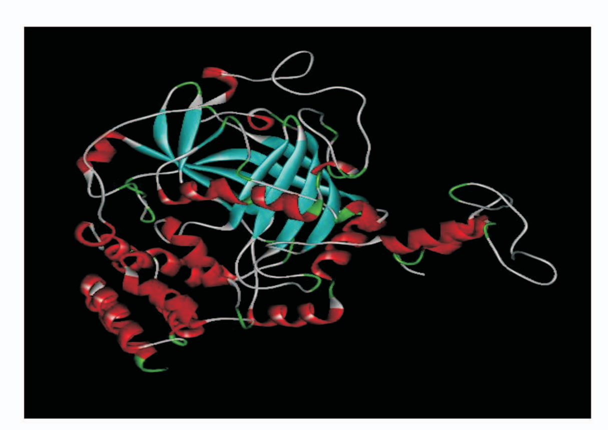


图 4　SexiCAT 的三维结构模型

Fig. 4　Three-dimensional structure modeling of SexiCAT

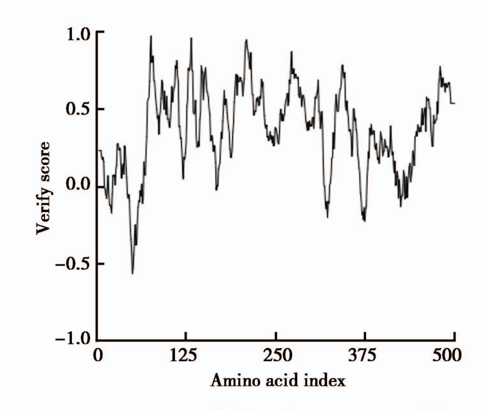


图 5　SexiCAT 三维模型的 Profile-3D 分析

Fig. 5　Profile-3D analysis on three-dimensional model of SexiCAT

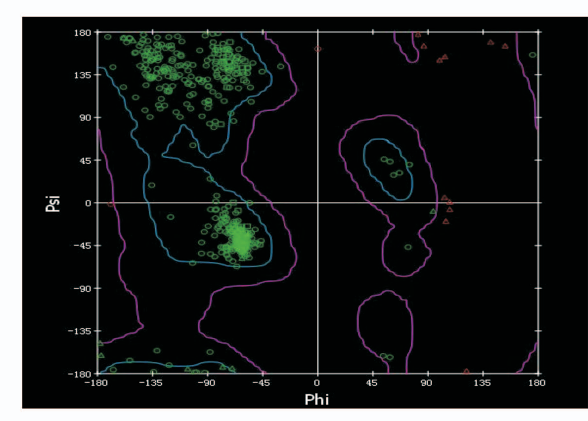


图 6 SexiCAT 三维模型的拉氏图分析
Fig. 6 The Ramachandran plots of SexiCAT

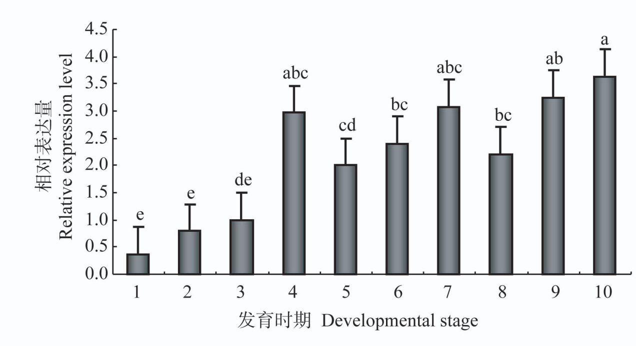


图 7 不同发育阶段甜菜夜蛾 *SexiCAT* 的相对表达量
Fig. 7 Relative expression level of *SexiCAT* in different developmental stage of *Spodoptera exigua*

柱上不同字母表示不同处理间的差异性显著($P<0.05$)；图 8 同。Different letters above bars indicate significant differences between different treatments ($P<0.05$). The same for Fig. 8.

1：卵 Egg；2：初孵幼虫 Newly hatched larva；3：1 龄幼虫 1st instar larva；4：2 龄幼虫 2nd instar larva；5：3 龄幼虫 3rd instar larva；6：4 龄幼虫 4th instar larva；7：5 龄幼虫 5th instar larva；8：预蛹 Prepupa；9：蛹 Pupa；10：成虫 Adult.

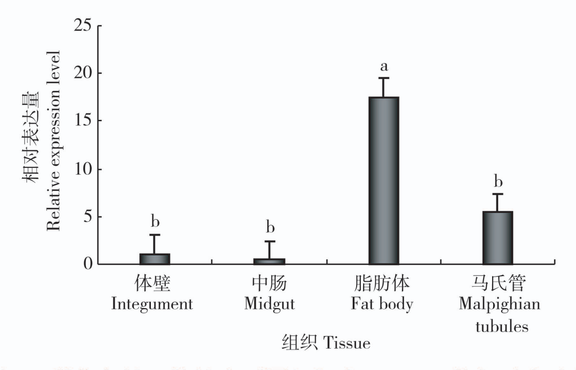


图 8 甜菜夜蛾 5 龄幼虫不同组织中 *SexiCAT* 的相对表达量
Fig. 8 Relative expression level of *SexiCAT* in different tissues of 5th instar larvae of *Spodoptera exigua*

理代谢作用有关(Nabizadeh and Kumar, 2011)。另外，本研究通过同源建模的方法得到了 *SexiCAT* 的三维结构，并进行了可靠性分析，结果显示，CAT 蛋白中 98% 的氨基酸残基结构合理。这将为进一步确定其功能位点以及与化合物的结合位点分析提供了理论基础。

总之，随着对昆虫 CAT 基因及其功能位点的深入研究，今后可以研制出以 CAT 作为靶标的新型氧化酶抑制剂，以显著降低昆虫通过环境胁迫及自身所产生过多的活性氧自由基的清除能力以及对农药的抗性，实现对昆虫高效，对哺乳动物安全的目标，这将是一条新的防治害虫途径。

参 考 文 献 (References)

Brezniceanu ML, Liu F, Wei CC, Chenier I, Godin N, Zhang SL, File PJG, Ingelfinger JR, Chan JSD, 2008. Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. *Diabetes*, 57(2): 451–459.

Brown-Borga HM, Rakoczy SG, 2000. Calatase expression in delayed and premature aging mouse models. *Experimental Gerontology*, 35(2): 199–212.

Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO, 1977. Production of superoxide redicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome C reductase from beef-heart mitochordria. *Arch. Biochem., Biophys.*, 180(2): 248–257.

Diaz-Albiter H, Mitford R, Genta FA, Sant' Anna MR, Dillon RJ, 2011. Reactive oxygen species scavenging by catalase is important for female *Lutzomyia longipalpis* fecundity and mortality. *PLoS ONE*, 6(3): e17486.

Griswold CM, Matthews AL, Bewley KE, Mahaffey JW, 1993. Molecular characterization and rescue of acatalasemic mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 134(3): 781–788.

Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, Tatematsu S, Hara Y, Minakuchi H, Washida N, Tokuyama H, Hayashi K, Itoch H, 2008. Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 372(1): 51–56.

Koepke JI, Wood CS, Terlecky LJ, Walton PA, Terlecky SR, 2008. Progeric effects of catalase inactivation in human cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(1): 99–108.

Kregel KC, Zhang HJ, 2007. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects and pathological considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 292(1): R18–R36.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Lopez-Martinez G, Elnitsky MA, Benoit JB, Lee RE, Denlinger DL, 2008. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock proteins.

Insect Biochem. Mol. Biol., 38(8): 796–804.

Magalhaes T, Brackney DE, Beier JC, Foy BD, 2008. Silencing an *Anopheles gambiae* catalase and sulfhydryl oxidase increases mosquito mortality after a blood meal. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 68(3): 134–143.

Matsumura T, Tabayashi N, Kamagata Y, Souma C, Saruyama H, 2002. Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 116(3): 317–327.

Miyagawa Y, Tamoi M, Shigeoka S, 2000. Evaluation of the defence system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.*, 41(3): 311–320.

Murthy MR, Reid TJ 3rd, Sicignano A, Tanaka N, Rossmann MG, 1981. Structure of beef liver catalase. *Journal of Molecular Biology*, 152(2): 465–499.

Orr EC, Bewley GC, Orr WC, 1990. cDNA and deduced amino acid sequence of *Drosophila* catalase. *Nucleic Acids Research*, 18(12): 3663.

Polidoros AN, Mylona PV, Scandalios JG, 2001. Transgenic tobacco plants expressing the maize Cat2 gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress. *Transgenic Res.*, 10(6): 555–569

Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA, 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 296(1): 295–309.

Sambrook J, Ritsch EF, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schrader M, Fahimi HD, 2006. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta*, 1763(12): 1755–1766.

Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS, 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 308(5730): 1909–1911.

Shikanai T, Takeda T, Yamauchi H, Sano S, Tomizawaa K, Yokota A, Shigeokab S, 1998. Inhibition of ascorbate peroxidase underoxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. *FEBS Letters*, 428(1): 47–51.

Terlecky SR, Koepke JI, Walton PA, 2006. Peroxisomes and aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(12): 1749–1754.

Yamamoto K, Banno Y, Fujii H, Miake F, Kashige N, Aso Y, 2005. Catalase from the silkworm, *Bombyx mori*: gene sequence, distribution, and overexpression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4): 277–283.

（责任编辑：赵利辉）